

OBTENÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES POR MEIO DE PCR-RFLP DE GENES RELACIONADOS COM QUALIDADE EM CAFÉ

Otávia T. Vilella^{2a}, Sergio D. Lannes^{2b}, David Pot^{2,3}, Lucia P. Ferreira^{2b}, Regina Helena G. Priolli⁴, Luis Carlos S. Ramos⁵, Carlos Augusto Colombo⁵, Luiz Gonzaga E. Vieira², Luiz Filipe P. Pereira⁶

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

^{2a} Bolsista Iniciação Científica IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná), Londrina-PR

^{2b} Bolsista CBP&D/Café, IAPAR, Londrina, PR

³ CIRAD, UMR DAP, Montpellier, França

⁴ ESALQ/USP, Departamento de Genética, Piracicaba-SP

⁵ IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), CPD de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas-SP

⁶ Embrapa Café, LBI/IAPAR Londrina PR Ipereira@iapar.br

RESUMO: A qualidade de bebida do café é fator fundamental para sua comercialização, pois agrega valor ao produto, garantindo maior competitividade e melhores preços no mercado. A composição química do café é um dos fatores que determinam a qualidade da bebida. Seu sabor e seu aroma são resultantes da presença combinada de vários constituintes, dentre os quais os ácidos clorogênicos, os diterpenos e os açúcares. O objetivo deste trabalho foi buscar polimorfismos a partir de PCR-RFLP utilizando *primers* baseados em sequências ESTs de genes relacionados com a qualidade de bebida. Para isso foi utilizado o DNA de uma população F₂ formada a partir da autofecundação de um híbrido interespecífico de *Coffea arabica* e *C. canephora*. Os resultados revelaram um total de doze marcas polimórficas na população. Dentre essas marcas, quatro foram obtidas através da presença e da ausência da amplificação dos genes. Oito combinações polimórficas foram obtidas através da clivagem do produto de PCR por quatro enzimas de restrição (*TaqI*, *BsuRI*, *RsaI* e *HhaI*). Com a validação dos polimorfismos encontrados nos amplicons, essas marcas estão sendo utilizadas para trabalhos de mapeamento na população de arabustas com objetivo de identificar QTLs relacionados à concentração de compostos como cafeína, ácidos clorogênicos, diterpenos, açúcares, bem como de proteases.

Palavras-chave: *Coffea spp.*, compostos químicos, enzimas de restrição, ESTs, genes candidatos, qualidade de bebida.

OBTENTION OF MOLECULAR MARKERS BY PCR-RFLP OF GENES ASSOCIATED WITH COFFEE QUALITY

ABSTRACT: Coffee cup quality is a fundamental aspect for its commercialization as it aggregates value to the product, allowing competitiveness and better market prices. The coffee chemical composition is one of the factors that determine the cup quality. Coffee flavor and aroma result from several components, among which are chlorogenic acids, diterpenoids and sugars. The purpose of this study was to find PCR-RFLP polymorphisms using primers based on EST sequences of genes putatively involved in coffee cup quality. For this, a F₂ population of an interspecific hybrid of *Coffea arabica* and *C. canephora* was used. The results revealed twelve polymorphic markers in the population. Among these markers, four were obtained due to the presence or the absence of amplicons. Eight polymorphic combinations were obtained by the cleavage of PCR product using four restriction enzymes (*TaqI*, *BsuRI*, *RsaI* e *HhaI*). With the validation of polymorphisms, these marks are being used for genetic mapping in this population to identify QTLs related to coffee bean components such as caffeine, chlorogenic acids, diterpenes and sugars.

Key words: *Coffea spp.*, chemical compounds, restriction enzymes, ESTs, candidate genes, cup quality.

INTRODUÇÃO

A composição química do café é um dos fatores que determinam a qualidade da bebida (Favarin *et al.*, 2004). Seu sabor e aroma são resultantes da presença de constituintes químicos tais como, os ácidos clorogênicos, os diterpenos e os açúcares. A cafeína, um dos principais componentes químicos do café, não tem influência no sabor e no aroma, mas é um dos compostos mais importantes com relação às qualidades nutracêuticas da bebida. Os teores dos compostos químicos presentes nos grãos de café variam de acordo com as diferentes espécies de *Coffea* (Leroy *et al.*, 2006), sendo a variação destes compostos entre e dentro das espécies comerciais de café, *C. arabica* e *C. canephora*, um importante caráter para o melhoramento genético das mesmas.

A identificação dos genes ligados à qualidade de bebida do café é um dos principais objetivos de diversas pesquisas realizadas visando o melhoramento de cafeeiros (Ferrão *et al.*, 2007). Marcadores moleculares ligados a características de importância econômica, como a qualidade de bebida, podem permitir a seleção em gerações segregantes, minimizando os custos e o tempo no desenvolvimento de novas variedades, principalmente em se tratando de culturas perenes como o café.

Atualmente, existe grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para diversas espécies vegetais e esses marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações (Caixeta *et al.*, 2009). Uma das principais utilizações dos marcadores moleculares é a construção de mapas genéticos ou de ligação, com objetivo de localizar QTLs de interesse. Entretanto, este é um processo demorado e dispendioso que, juntamente com o baixo nível de diversidade genética dentro da espécie, dificultam a construção do mapa genético para *C. arabica* (Pearl *et al.*, 2004). Estudos com marcadores de DNA revelaram que a variedade “Híbrido de Timor”, derivada de um cruzamento interespecífico espontâneo entre *C. arabica* e *C. canephora*, apresentou maior diversidade genética, facilitando o trabalho de mapeamento genético (Lashermes *et al.*, 2000).

Para facilitar o desenvolvimento de novos marcadores moleculares para o café, uma das metodologias é a análise de seqüências dos bancos de dados. As seqüências transcritas de DNA, Expressed Sequenced Tag (EST), disponibilizadas nos bancos públicos, são fontes atrativas para a identificação de marcas polimórficas baseadas nas seqüências de genes candidatos (Hu e Vick, 2003). As marcas são geradas pela combinação de *primers* desenhados a partir das seqüências EST de interesse. Para aumentar as chances de obtenção de marcadores polimórficos, o produto de amplificação via PCR pode ser digerido por enzimas de restrição gerando polimorfismos de tamanho (Konieczny e Ausubel, 1993). Portanto, o objetivo deste trabalho foi buscar polimorfismos nos genes relacionados com qualidade de bebida, através da metodologia de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição), em uma população de mapeamento originária de um cruzamento interespecífico de *C. arabica* e *C. canephora*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a busca de polimorfismos relacionados com a qualidade de bebida do café foi utilizada uma população F2 constituída de 144 plantas obtidas na estação experimental do IAC, em Mococa-SP. A geração segregante F2 foi obtida a partir do cruzamento entre o parental (1) *C. arabica* cv. Bourbon Vermelho e o parental (2) *C. canephora* cv. Robusta duplicado e da autofecundação do híbrido tetraplóide F1. O material resultante deste cruzamento revela teores variados de cafeína, ácidos clorogênicos, diterpenos e açúcares, sendo propício para obtenção de marcas genômicas.

Folhas de plantas adultas da geração F₂ foram colhidas na estação experimental do IAC e enviadas ao IAPAR, em Londrina-PR. As amostras foliares foram maceradas em nitrogênio líquido e congeladas a -80°C. A extração de DNA das amostras foi realizada seguindo o protocolo de extração do método MATAB (Risterucci, 2000) e quantificado em espectrofotômetro.

No banco de ESTs do projeto “Genoma Café” foram realizadas buscas de seqüências relacionadas com as rotas da biossíntese de cafeína, ácidos clorogênicos, diterpenos e açúcares (Vieira *et al.*, 2006). Foram selecionados quatro genes para açúcares: sacarose sintase (SUS), invertase de parede celular (CWI), fosfato sintase de sacarose (SPS), UDP glucose pirofosforilase (UGPase); seis para diterpenos: kaureno oxidase (KO), 1-deoxy-D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase (DXR), 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase – (HMGR), isopentenil difosfato sintase (IDS), mevalonato difosfato decarboxilase (MPDC), 2C-metil-D-eritritol-2, 4-ciclodifosphate sintase (MECPS), cinco para ácidos clorogênicos: fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato 4-hiroxilase (C4H), coumarato 3-hidroxilase (C3H), hidroxicinamoil-CoA ligase (4CL) e hidroxicinamoil-CoA:D-quinato hidroxicinamoil transferase (CQT); e cinco para a cafeína: cafeína sintase (CFS), teobromina sintase (TBS), N- metil transferase (NMT), xantosina metil transferase (XMT), S-adenosil-l-metionina (SAM). Para alguns genes foram desenhados mais de um par de primers em um total de 53 pares (Tabela 1).

A amplificação dos genes foi realizada via PCR utilizando *primers* específicos e estas foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose, na concentração de 1%. Os produtos da amplificação que não revelaram polimorfismos foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *TaqI*, *BsuRI*, *RsaI* e *HhaI* (10 U por reação), para verificar a presença de polimorfismos de restrição entre os indivíduos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram definidos 53 pares de *primers* para os genes candidatos nas rotas metabólicas de alguns dos principais compostos presentes no grão de café: cafeína, ácidos clorogênicos, diterpenos e açúcares. Os *primers* foram testados inicialmente nos dois parentais, no híbrido F1 e em uma amostra de nove indivíduos F2 da população de mapeamento. Cinquenta pares de *primers* produziram amplificadas nessa etapa inicial. Dentre estes *primers*, somente quatro revelaram polimorfismo de ausência e presença (TBS_1A, CWI_S2, CWI_C2, SUS_S2), que quando testados em toda a população (144 indivíduos) apresentaram segregação de 3:1 e 1:1 (Figura 1). Visando aumentar o número de polimorfismo, as reações que apresentaram bandas monomórficas foram digeridas separadamente com quatro enzimas de restrição (*TaqI*, *BsuRI*, *RsaI* e *HhaI*) que revelaram seis combinações polimórficas (SAM_A x *BsuRI*; SPS_S1 x *RsaI*; IDS_C1 x *TaqI*; HMGR_C3 x *BsuRI*; 4CL_C6 x *RsaI*; 4CL_C7 x *BsuRI*; PAL_C3 x *BsuRI*; CQT_C4 x *BsuRI*) (Tabela 1, Figura 2). Duas dessas combinações revelaram duas bandas polimórficas (HMGR_C3 x *BsuRI* e IDS_C1 x *TaqI*) enquanto as outras combinações apresentaram uma banda polimórfica.

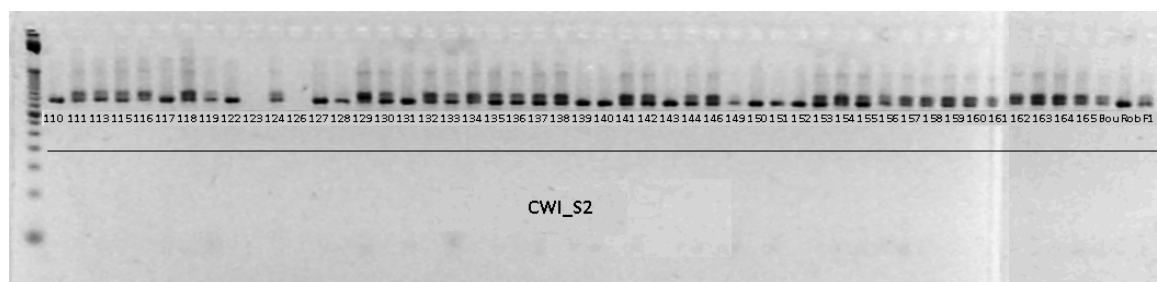


Figura 1 – Presença de polimorfismos gerados por amplificação do gene de invertase de parede (primer CWI_S2) Colunas representam fragmentos de DNA amplificados de indivíduos da população (110 até 165), incluindo os parentais Robusta (Rob) e Bourbon (Bou) e o F1.

Tabela 1: Resultado de análise de polimorfismos nas combinações de primers e enzimas de restrição na população segregante F2 (*C. arabica* x *C. canephora*)

Enzima de Restrição					Enzima de Restrição				
Primer	<i>TaqI</i>	<i>RsaI</i>	<i>BsuRI</i>	<i>HhaI</i>	Primer	<i>TaqI</i>	<i>RsaI</i>	<i>BsuRI</i>	<i>HhaI</i>
Cafeína					Ac.Clorogênicos				
3,7DMT_B	-	-	-	-	PAL_C1	-	-	-	-
CFS_1 ^a	-	-	-	-	PAL_C3	-	-	+	-
CFS_1B	-	-	-	-	PAL_C4	-	-	-	-
CFS_1C	-	-	-	-	C4H_C4	-	-	-	-
CFS_1D	-	-	-	-	4CL_C2	-	-	-	-
CFS_4	-	-	-	-	4CL_C3	-	-	-	-
NMT_A	-	-	-	-	4CL_C4	-	-	-	-
NMT_B	-	-	-	-	4CL_C5	-	-	-	-
NMT_C	-	-	-	-	4CL_C6	-	-	+	-
SAM_A	-	-	+	-	4CL_C7	-	-	-	-
SAM_B	-	-	-	-	C3`H_C13	-	-	-	-
TBS_2B	-	-	-	-	CQT_C1	-	-	-	-
TBS_2C	-	-	-	-	CQT_C4	-	-	-	-
TBS_1A*	-	-	-	-	CQT_C11	-	-	-	-
Açúcares					Diterpenos				
CWI_C1	-	-	-	-	KO_C2	-	-	-	-
CWI_C2*	-	-	-	-	HMGR_C1	-	-	-	-
CWI_C3	-	-	-	-	HMGR_C2	-	-	-	-
CWI_C5	-	-	-	-	HMGR_C3	-	-	+	-
CWI_C8	-	-	-	-	HMGR_Sing1	-	-	-	-
CWI_sing1	-	-	-	-	IDS_C1	+	-	-	-
CWI_sing2*	-	-	-	-	MECPS_C1	-	-	-	-
SUS_sing1	-	-	-	-	MPDC_C2	-	-	-	-
SUS_sing2 *	-	-	-	-	MPDC_C2	-	-	-	-
SUS_sing3	-	-	-	-					
SPS_C1a	-	-	-	-					
SPS_C1b	-	-	-	-					
SPS_C3	-	-	-	-					
SPS_s1	-	+	-	-					
SPS_s2	-	-	-	-					
UGPase_C1	-	-	-	-					

+ Combinação de Primer x Enzima de restrição polimórfica

- Combinação de Primer x Enzima de restrição monomórfica

* Polimorfismo de presença e ausência

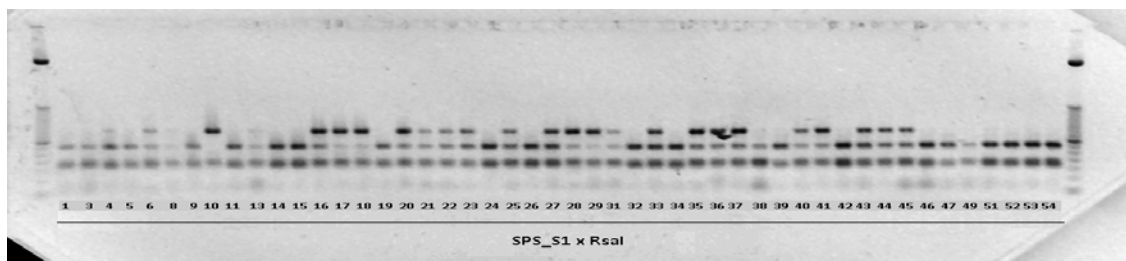


Figura 2 - Presença de polimorfismos gerados por digestão do fragmento do gene para sucrose fosfato sintase (primer SPS_S1) em digerido com enzima de restrição *RsaI*. Colunas representam fragmentos de DNA amplificados e digeridos de indivíduos da população (1 a 54).

A construção de um mapa genético para a espécie *C. arabica* é importante para o melhoramento da cultura do café, sobretudo na melhoria da qualidade de bebida. No entanto, a busca de marcadores moleculares para esta espécie não tem sido fácil devido à sua natureza tetraplóide e ao baixo nível de diversidade genética, atribuída ao número restrito de ancestrais e a autogamia da planta (Steiger *et al.*, 2002).

A utilização da técnica de amplificação de genes candidatos revelou polimorfismos dentro da população, porém em baixo número. Sendo assim, a digestão enzimática de produtos da PCR é uma alternativa para explorar a variação de sequência entre indivíduos de uma população (Ma *et al.*, 2004). Os polimorfismos gerados estão sendo incluídos dentro do mapa genético da população de Arabusta, com um custo relativamente baixo, pois utilizam recursos já disponíveis como o banco de EST do café e técnicas de fácil implementação em laboratórios de biologia molecular.

CONCLUSÕES

Apesar do baixo número de polimorfismos encontrado, a metodologia de PCR-RFLP em sequências ESTs é uma alternativa para aumentar o número de marcas polimórficas detectáveis e identificar marcadores funcionais dentro de uma população de mapeamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares *In*: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (eds.) **Marcadores Moleculares**. 2ª Edição UFV, Viçosa, 2009, p.11-93.
- FAVARIN, J.L.; VILLELA, A.L.G.; MORAES, M.H.D.; CHAMMA, H.M.C.P.; COSTA, J.D.; DOURADO-NETO, D. Qualidade de bebida de café de frutos cereja submetidos a diferentes manejos pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p.187-192, 2004.
- FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; VERDIM FILHO, A.C.; VOLPI, P.S. Melhoramento genético de *Coffea canephora* *In*: FERRÃO, R.V.; FONSECA, A.F.A.; BRAGANÇA, S.M.; FERRÃO, M.A.G.; MUNER, L.H. (eds.). **Café Conilon**. ES: Incaper, 2007, p.123-163.
- HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, p.289-294, 2003.
- KONIECZNY A. e AUSUBEL F. M. Procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. **The Plant Journal**, v. 4 (2), p. 403-410, 1993.
- LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B.; COMBS, M.C.; DUSSERT S.S.; GRAZIOSI, G.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, A. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 139-146, 2000.
- LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P.; DUFOUR, M.; MONTAGNON, C.; MARRACCINI, P.; POT, D. Genetic of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.229-242, 2006.
- MA, Z. Q.; WEI, J. B.; CHENG, S.H. PCR-based markers for the powdery mildew resistance gene Pm4a in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.140-145, 2004.
- PEARL, H.M.; NAGAI, C.; MOORE, P.H.; STEIGER, D.L.; OSGOOD, R.V.; MING, R. Construction of a genetic map for Arabica coffee. **Theor Appl Genet** 108:829-835, 2004.
- RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J.A.K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, H.M.; LANAUD, C. A. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 948-955, 2000.

STEIGER, D.L.; NAGAI, C.; MOORE, P.H.; MORDEN, C.W.; OSGOOD, R.V.; MING, R. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 209-215, 2002.

VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.L.; COLOMBO, C.A. et al. Brazilian coffee genome Project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 95-108, 2006.